

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1. Proses isolasi**

Proses isolasi enzim selulase dari bekicot ini dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu ekstraksi, sentrifugasi, fraksinasi dan dialisis. Tiap-tiap tahap yang dilakukan bertujuan untuk memperoleh enzim selulase dengan kemurnian yang lebih tinggi sehingga bisa diperoleh aktivitas spesifik yang lebih besar.

##### **4.1.1. Ekstraksi**

Enzim selulase dari bekicot terdapat dalam hepatopankreasnya. Karena enzim ini terdapat pada bagian dalam dari bekicot, maka perlu dilakukan proses ekstraksi untuk mengeluarkan enzim. Untuk mengekstrak enzim ini diperlukan pengrusakan atau penghancuran organ yang dapat dilakukan secara fisik, mekanik atau kimiawi. Pada proses isolasi ini dilakukan penghancuran secara mekanik dengan menggunakan blender dan NaCl 1% dingin sehingga dapat homogen. Homogenat yang diperoleh ini kemudian disaring dan dilakukan dialisis awal untuk menghilangkan NaCl.

##### **4.1.2. Sentrifugasi**

Sentrifugasi ini dilakukan pada tahap awal setelah dialisis dan pada tahap setelah fraksinasi. Sentrifugasi pada tahap awal dilakukan untuk memisahkan larutan enzim dari hancuran hepatopankreas bekicot. Sedangkan pada tahap setelah fraksinasi dilakukan untuk memisahkan protein enzim yang sudah

terendapkan dari filtratnya dan supernatan yang diperoleh akan digunakan untuk fraksinasi lebih lanjut.

Setelah melalui tahap ekstraksi dan sentrifugasi, diperoleh enzim yang disebut sebagai ekstrak kasar. Ekstrak kasar ini kemudian diuji aktivitas dan aktivitas spesifiknya dengan menggunakan tiga macam substrat, yaitu kertas saring, CMC dan selobiosa. Pengujian dengan menggunakan tiga macam substrat ini dilakukan karena enzim selulase merupakan enzim multi kompleks yang terdiri atas 3 komponen, yaitu :<sup>(3,5)</sup>

1. Enzim C1 ( ekso- $\beta$ -1,4-glukanase ). Enzim ini bekerja pada daerah selulosa kristalin dan dirombak menjadi selulosa amorf dengan susunan yang renggang.
2. Enzim Cx ( endo- $\beta$ -1,4-glukanase ). Enzim ini bekerja pada daerah selulosa amorf.
3. Enzim  $\beta$ -glukosidase atau selobiase yang bekerja mengubah selobiosa menjadi glukosa.

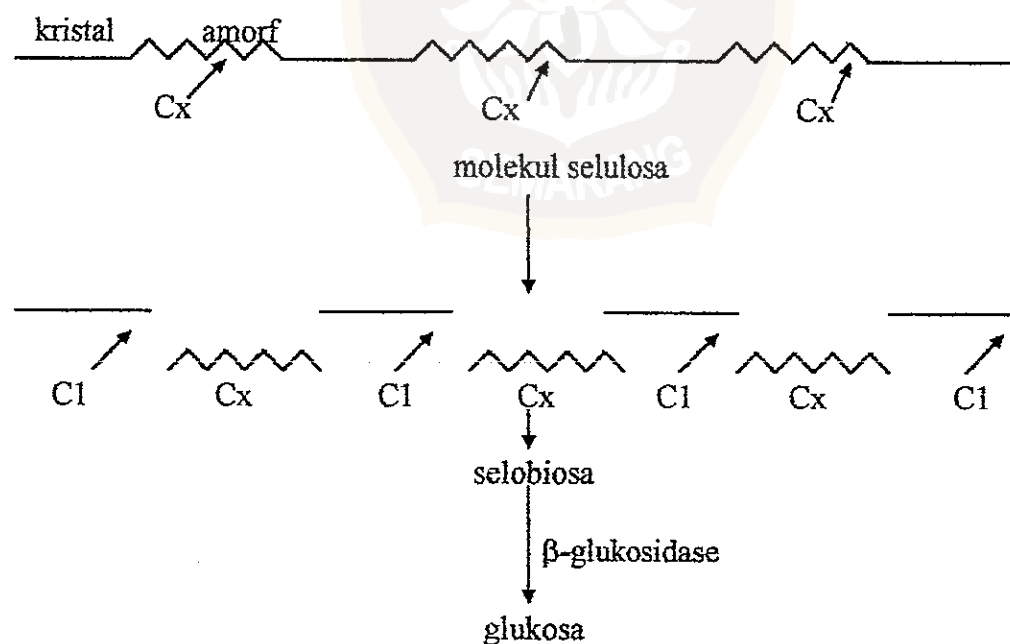
Karena itu, untuk mengetahui jenis enzim selulase dari bekicot, dilakukan uji aktivitas dengan menggunakan tiga macam substrat. Kertas saring digunakan untuk uji aktivitas enzim selulase jenis eksoglukanase, CMC untuk uji aktivitas enzim endoglukanase dan selobiosa untuk uji aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase.<sup>(3)</sup>

Dari hasil uji aktivitas diperoleh hasil sebagai berikut :

Tabel IV.1. Uji aktivitas ekstrak kasar

No.	Jenis substrat	Aktivitas ( U/mL )	Protein ( mg/mL )	Aktivitas spesifik ( U/mg )
1.	Kertas saring	19,876	2,191	9,072
2.	CMC	22,184	2,191	10,125
3.	Selobiosa	21,158	2,191	9,657

Dari hasil tersebut diketahui bahwa komponen terbesar enzim selulase dari bekicot adalah jenis enzim Cx (  $\text{endo-}\beta\text{-1,4-glukanase}$  ), meskipun hasil tersebut tidak berbeda jauh dengan kedua jenis enzim yang lain. Karena enzim selulase dari bekicot mengandung ketiga jenis enzim selulase, maka diperkirakan enzim selulase dari bekicot ini dapat digunakan untuk menghidrolisa semua bahan-bahan yang mengandung selulosa, baik selulosa kristal maupun amorf, dengan adanya sinergisme antara ketiga jenis enzim tersebut yang dapat dilihat pada gambar di bawah ini :<sup>(6)</sup>



Gambar IV.1. Sinergisme enzim selulase

Enzim ekso- $\beta$ -1,4-glukanase ( C1 ) dapat bekerja pada bagian kristal selulosa dan enzim ini hanya dapat bekerja dari bagian pinggir suatu rantai selulosa, sedangkan enzim endo- $\beta$ 1,4-glukanase ( Cx ) dapat bekerja pada bagian amorf selulosa, dan enzim ini dapat bekerja pada bagian dalam rantai selulosa. Enzim ini dapat memperpendek rantai selulosa sehingga dapat membantu kerja enzim ekso- $\beta$ -1,4-glukanase. Dengan adanya jenis enzim ketiga, yaitu enzim  $\beta$ -glukosidase, kerja enzim dari bekicot akan lebih sempurna karena enzim ini yang akan mengubah selobiosa hasil pemutusan rantai selulosa oleh enzim ekso- $\beta$ -1,4-glukanase dan enzim endo- $\beta$ -1,4-glukanase menjadi glukosa.

Hasil uji aktivitas ekstrak kasar ini digunakan sebagai dasar untuk uji aktivitas selanjutnya, dengan menggunakan CMC sebagai substrat, karena aktivitas dengan menggunakan substrat CMC adalah yang paling besar.

#### 4.1.3. Fraksinasi

Tahap selanjutnya setelah sentrifugasi dan uji aktivitas ekstrak kasar adalah tahap fraksinasi. Fraksinasi dilakukan untuk lebih memurnikan dan meningkatkan aktivitas spesifik enzim. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan, yaitu fraksi ke-1 atau F1 dengan kejenuhan 0 - 10%, F2 dengan kejenuhan 10 - 20%, F3 dengan kejenuhan 20 - 40%, F4 dengan kejenuhan 40 - 60%, F5 dengan kejenuhan 60 - 80% dan F6 dengan kejenuhan 80 - 100%. Pada kejenuhan tertentu akan terjadi peristiwa "Salting-out", yaitu terjadinya pengendapan protein oleh garam amonium sulfat. Terjadinya pengendapan ini karena hidrasi sejumlah besar ion-

ion garam yang membutuhkan sejumlah pelarut, kemudian menurunkan kelarutan protein sehingga menginduksi interaksi protein-protein untuk pengendapan. Adapun konsentrasi garam yang dibutuhkan untuk pengendapan adalah spesifik untuk tiap-tiap kelompok protein. <sup>(13)</sup>

Karena itu, proses fraksinasi dilakukan pada berbagai tingkat kejenuhan sehingga dapat diketahui pada tingkat kejenuhan berapakah enzim selulase dapat mengendap secara optimal. Proses ini dilanjutkan dengan sentrifugasi dan endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer asetat 0,05 M; pH 5.

#### 4.1.4. Dialisis

Proses dialisis ini dilakukan untuk membebaskan protein dari amonium sulfat. Pada proses ini digunakan kantong selofan sebagai membran semi permeabel, dimana terjadi distribusi ion-ion garam yang terdapat di dalam kantong selofan dengan larutan buffer asetat 0,0005 M; pH 5 yang terdapat di luar kantong selofan. Ion-ion garam ( $\text{NH}_4^+$  dan  $\text{SO}_4^-$ ) akan keluar dari dalam kantong selofan, sedangkan molekul protein akan tetap berada di dalam kantong selofan. Sedangkan penggunaan larutan buffer pada proses ini adalah untuk mempertahankan pH, karena kerja enzim sangat dipengaruhi oleh pH. Jika digunakan air, dikhawatirkan akan terjadi perubahan pH di dalam kantong selofan dan di luar kantong selofan, dimana ion  $\text{H}^+$  dan  $\text{OH}^-$  yang berada di luar kantong selofan dapat masuk ke dalam kantong selofan sehingga dapat menaikkan atau menurunkan pH di dalam atau di luar kantong selofan. <sup>(11)</sup>

Setelah dialisis, masing-masing fraksi kembali diuji aktivitasnya untuk mengetahui pada fraksi keberapakah enzim selulase dapat diperoleh secara

optimal. Adapun hasil uji aktivitas tiap fraksi dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel IV.2. Uji aktivitas tiap-tiap fraksi

No.	Fraksi	Aktivitas ( U/mL )	Protein ( mg/mL )	Aktivitas spesifik ( U/mg )
1.	F1 ( 0-10% )	15,647	0,851	18,387
2.	F2 ( 10-20% )	18,594	0,958	19,409
3.	F3 ( 20-40% )	36,670	3,212	11,417
4.	F4 ( 40-60% )	39,747	2,920	13,612
5.	F5 ( 60-80% )	54,617	1,264	43,210
6.	F6 ( 80-100% )	25,132	0,747	33,644

Dari hasil uji aktivitas dapat diketahui bahwa aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada fraksi ke-5 ( F5 ). Hal ini berarti bahwa enzim selulase dapat terendapkan secara optimal dengan menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 60 - 80%. Pada tiap-tiap fraksi tampak adanya aktivitas dari enzim selulase. Hal ini berarti pada tiap fraksi ada sejumlah enzim selulase yang terendapkan, tapi tidak optimal karena protein-protein lain juga banyak yang diendapkan sehingga aktivitas spesifiknya kecil. Sedangkan pada fraksi ke-5 diketahui bahwa aktivitas spesifik yang diperoleh besar. Hal ini berarti enzim selulase benar-benar terendapkan secara optimal pada tingkat kejenuhan 60 - 80%.

Pada uji aktivitas dilakukan uji gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi dan uji protein dengan metode Lowry. Pada uji gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi, glukosa dioksidasi oleh  $\text{Cu}^{2+}$  sehingga akan terbentuk endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  yang selanjutnya ditambah dengan arseno-molybdat hingga larut dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 440 nm. <sup>(19)</sup>

Sedangkan uji protein dilakukan dengan metode Lowry yang menggunakan reagen Lowry dan folin. Warna biru yang terjadi disebabkan karena reaksi kompleks koordinasi antara ion Cupri (  $\text{Cu}^{2+}$  ) dan nitrogen dari rantai peptida pada suasana alkalis. Larutan ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 640 nm. <sup>(20)</sup>

#### 4.2. Karakterisasi enzim selulase

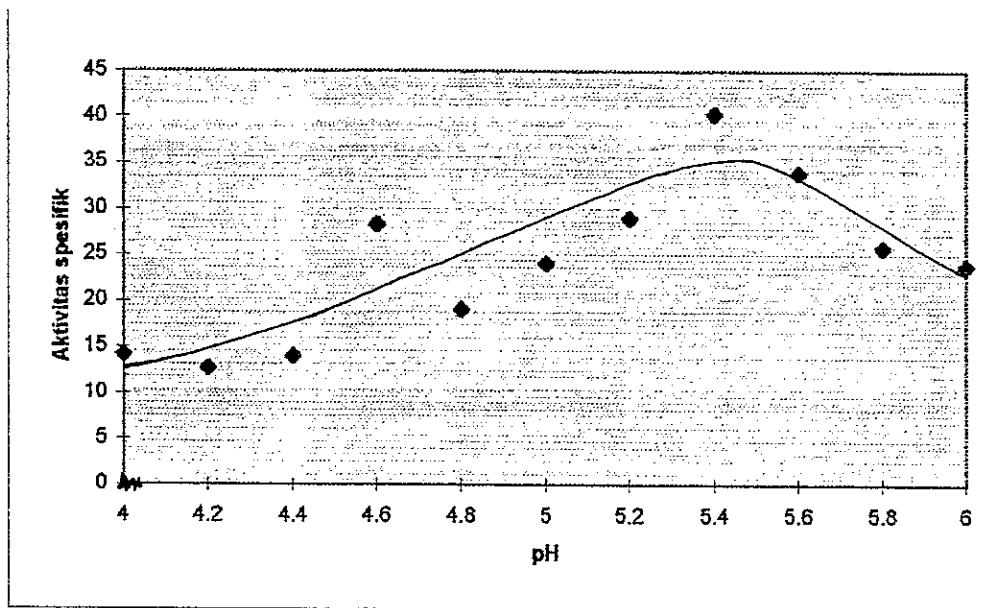
Setelah proses isolasi selesai, dilanjutkan dengan karakterisasi enzim selulase dengan penentuan pH optimum, suhu optimum dan waktu inkubasi optimum. Karakterisasi ini dilakukan dengan menggunakan fraksi ke-5 karena aktivitas spesifiknya terbesar.

##### 4.2.1. Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan reaksi enzim pada berbagai pH mulai dari pH 4 - 6 dengan substrat CMC dalam buffer asetat, dan diinkubasi pada suhu 39°C selama 45 menit.

Penentuan pH optimum untuk enzim selulase dari bekicot dapat dilihat dari grafik di bawah ini.





Grafik IV.1. Penentuan pH optimum

Berdasarkan grafik dapat diketahui bahwa aktivitas spesifik enzim meningkat dengan kenaikan pH dan aktivitas spesifik terbesar dicapai pada pH 5,4 yaitu sebesar 40,363 U/mg. Setelah mencapai keadaan optimal, aktivitas spesifik enzim mengalami penurunan dengan adanya kenaikan pH. Hal ini menunjukkan bahwa kerja enzim sangat dipengaruhi oleh perubahan pH. Pada pH yang terlalu rendah atau terlalu tinggi, enzim tidak dapat bekerja dengan baik dan dapat mengalami kerusakan sehingga aktivitasnya tidak tampak sama sekali. Pengendalian pH yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim sangat diperlukan dalam praktek teknologi pangan. Dalam industri pangan yang menggunakan enzim, pengaturan pH dilakukan untuk mendapatkan aktivitas enzim yang maksimal

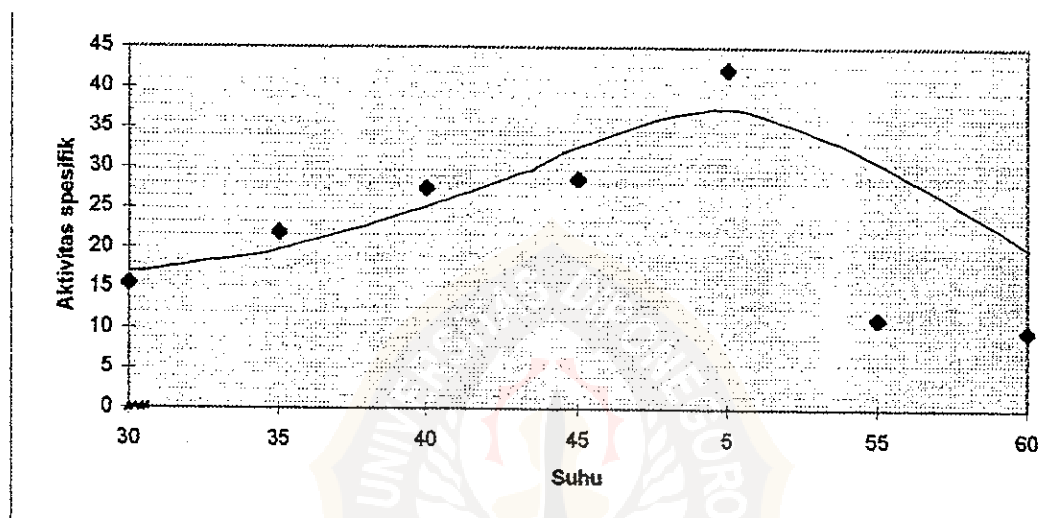
#### 4.2.2. Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan melakukan reaksi enzim pada berbagai variasi suhu mulai dari 30 - 60°C dengan substrat CMC dalam buffer



asetat pH 5,4 dan diinkubasi selama 45 menit. Variasi suhu dilakukan mulai dari suhu 30 - 60°C karena berdasarkan literatur diketahui bahwa enzim selulase dapat bekerja optimal pada suhu antara 30 - 65°C. Sedangkan penggunaan pH 5,4 berdasarkan hasil pada penentuan pH optimum, di mana aktivitas spesifik enzim selulase terbesar dicapai pada pH 5,4.

Penentuan suhu optimum dapat dilihat dari grafik di bawah ini :



Grafik IV.2. Penentuan suhu optimum

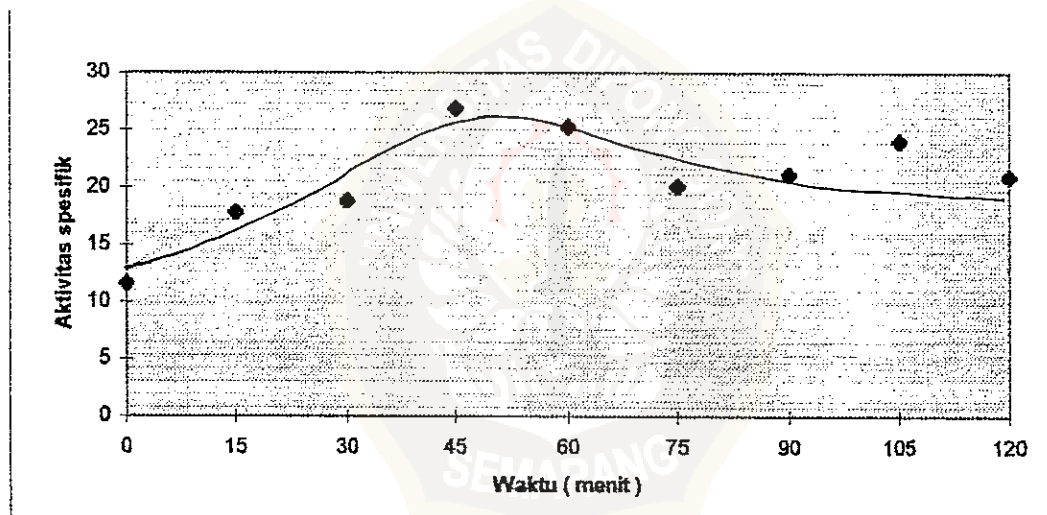
Berdasarkan grafik diketahui bahwa dengan semakin tinggi suhu, aktivitas spesifik enzim semakin meningkat dan aktivitas spesifik terbesar dicapai pada suhu 50°C yaitu sebesar 43,231 U/mg. Selanjutnya pada suhu yang lebih tinggi dari 50°C, aktivitas spesifik enzim mengalami penurunan yang tajam. Hal ini menunjukkan bahwa suhu sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Semakin tinggi suhu, semakin aktif kerja enzim tersebut hingga optimal pada suhu tertentu. Bila suhu dinaikkan terus, maka enzim akan mengalami kerusakan sehingga laju

kerusakan enzim akan melebihi reaksi katalisis enzim dan mengakibatkan reaksi enzimatik berhenti.

#### 4.2.3. Penentuan waktu inkubasi optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan melakukan reaksi enzim dengan menggunakan substrat CMC dalam buffer asetat pH 5,4 dan diinkubasi pada suhu 50°C dengan variasi waktu selama 0 - 120 menit. Penggunaan pH dan suhu di sini berdasarkan hasil yang diperoleh dari penentuan pH dan suhu optimum.

Penentuan waktu inkubasi optimum dapat dilihat pada grafik di bawah ini



Grafik IV.3. Penentuan waktu inkubasi optimum

Berdasarkan grafik tersebut dapat diketahui bahwa waktu inkubasi optimum dicapai pada waktu 45 menit dengan aktivitas spesifik sebesar 26,872 U/mg.

Penentuan waktu inkubasi optimum ini dilakukan dengan menggunakan 4,9 mL substrat ditambah dengan 0,1 mL enzim. Dengan semakin lamanya waktu inkubasi, aktivitas spesifik enzim mengalami peningkatan hingga optimal pada waktu 45 menit. Hal ini menunjukkan bahwa dengan komposisi enzim sebanyak

0,1 mL dan substrat 4,9 mL, waktu optimal yang dibutuhkan oleh enzim untuk mengadakan kontak dengan substrat sehingga menghasilkan produk (glukosa) adalah 45 menit. Banyaknya  $\mu\text{mol}$  glukosa yang terbentuk pada kondisi percobaan merupakan satuan unit aktivitas enzim. Tingginya harga aktivitas spesifik enzim dengan waktu inkubasi 45 menit menunjukkan bahwa dalam waktu 45 menit tersebut, enzim dapat bekerja pada substrat secara optimal. Setelah melampaui waktu inkubasi 45 menit, terjadi penurunan aktivitas spesifik enzim meskipun penurunan itu tidak terlalu tajam. Hal ini dapat disebabkan karena dengan semakin lamanya waktu inkubasi disertai dengan pemanasan pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$ , enzim dapat mengalami kerusakan karena adanya pemanasan yang terlalu lama.

#### **4.3. Pemanfaatan enzim selulase dari bekicot**

Enzim selulase dari bekicot ini dapat dimanfaatkan untuk menghidrolisa bahan-bahan yang mengandung selulosa. Salah satu pemanfaatan enzim ini adalah untuk menghidrolisa eceng gondok yang selama ini belum dimanfaatkan dan hanya menjadi gulma bagi habitat di sekelilingnya.

Dari literatur diketahui bahwa eceng gondok mengandung 40 - 50% selulosa. <sup>(18)</sup>

Dengan melalui proses perajangan bagian batang dan daun yang dilanjutkan dengan pengeringan dan pemblenderan, eceng gondok dapat digunakan sebagai substrat enzim selulase. Proses perajangan dan pemblenderan ini digunakan untuk memperbesar luas permukaan sehingga enzim bisa bekerja lebih optimal.

Pada penelitian yang sudah dilakukan, enzim direaksikan langsung dengan eceng gondok yang sudah halus pada kondisi optimum untuk enzim selulase dari bekicot, yaitu pada pH 5,4 dan suhu 50°C dengan waktu inkubasi 45 menit. Dari hasil penelitian diperoleh produk glukosa masing-masing sebesar 132,473 µg/mL untuk 0,0245 gram daun eceng gondok kering dan 206,775 µg/mL untuk 0,0245 gram batang eceng gondok kering. Adanya glukosa yang dihasilkan ini menunjukkan bahwa enzim selulase dari bekicot dapat menghidrolisa selulosa pada eceng gondok. Diperkirakan ketiga jenis enzim selulase yang terdapat dalam bekicot dapat bekerja secara sinergis untuk menghidrolisa selulosa eceng gondok menjadi glukosa karena kemungkina selulosa pada eceng gondok terdiri dari bagian kristal dan amorf sehingga memerlukan ketiga jenis enzim selulase tersebut.

Dengan demikian, enzim selulase dari bekicot dapat digunakan untuk pemanfaatan eceng gondok yang selama ini dianggap sebagai pengganggu bagi habitat di sekelilingnya.